

Obtención de azúcares fermentables a partir de inulinasas inmovilizadas por el método de sol-gel

Leandro Rodrigo González-González^{1,2}, Ignacio García Martínez^{1,2}, Rafael Pérez Bedolla²,
Karla Lorena Gutiérrez Paredes¹ y Anayeli García Cruz¹

¹Universidad Simón Bolívar, ²Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar el contenido de azúcares reductores disponibles por efecto de la inulinasa inmovilizada mediante el método de sol-gel, que consiste en la formación de redes sólidas compuestas por elementos inorgánicos; posterior a esto se determinó la actividad de la enzima inmovilizada con sustrato de inulina de Agave tequilana Weber var. Azul; con esto se logró cambiar las condiciones que en operación existen, reduciendo tiempos originados por la adición de ácido que hidroliza la inulina y la posterior neutralización con álcali.

Palabras clave: inulinasas, azúcares reductores, fructanos, sol-gel.

Abstract

The objective of this work was to determine the content of sugar reducers for the effect of the immobilized inulinase by means of the sol-gel method, which consists in the formation of solid nets composed by inorganic elements, and afterwards to determine the activity of the immobilized enzyme with substrate of inuline of Agave tequilana Weber var. Azul. With this, the existing conditions in operation were found to change, reducing times originated by the addition of acid that hydrolyzes inuline and the later neutralization with alkali.

Keywords: inulinases, sugar reducers, fructans, sol-gel

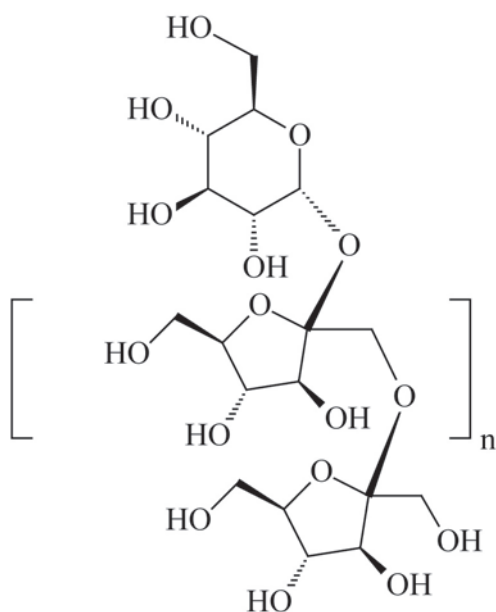
Introducción

A partir de la segunda mitad del siglo XX se introdujeron en la industria alimentaria los jarabes de fructosa obtenidos del maíz, lo que ha impactado en la economía de los países productores de azúcar de caña. En estos últimos años, se han puesto en evidencia los nuevos escenarios en los que la fructosa juega un papel central. Es en este sentido que destacan las fructanas, nombre genérico que se da a compuestos constituidos por largas cadenas de moléculas de fructosa unidas químicamente y que en forma de inulina o de levana constituyen el reservorio energético de una amplia diversidad de plantas de las cuales se incluye a tubérculos de la alcachofa

de Jerusalén (*Helianthus tuberosus L.*) y dalia (*Dahlia pinnata Cav.*), los bulbos de iris (*Iris sp*) y las raíces de dientes de león (*Taraxacum officinales Wekerl*) y la achicoria (*Chicorium intyvus L.*) o los agaves, de la misma forma se ha encontrado la inulina en varias hortalizas y cereales tales como cebolla, ajo, alcaucil, puerro, espárrago, y trigo (Arrazola, 1969; Wesche, 2000).

La inulina es un polímero lineal compuesto de cadenas de 25 a 35 residuos de fructosa unidas por enlaces glucosídicos $\beta(2 \rightarrow 1)$ y termina con una molécula de sacarosa (figura 1).

Figura 1. Molécula de inulina.



Algunos fructanos son ramificados, que en su conjunto forman un polvo blanco que está conformado por una mezcla de poli y oligosacáridos con una misma estructura química GF_n (G: Glucosa, F: Fructosa y n: número de unidades de fructosa ligadas una a la otra). El número máximo de unidades de fructosa en la inulina, extraída de la achicoria, por ejemplo, es alrededor de 60 (Singh, 2006).

De la inulina es posible obtener, mediante su hidrólisis enzimática parcial, diferentes compuestos como la oligofructosa, que consiste en una mezcla de oligosacáridos que es desarrollada para fines alimenticios (Marquina, 2005).

Recientemente se ha reportado que la inulina, como la oligofructosa son rápida y totalmente fermentadas por la microflora intestinal, siendo por tanto un "prebiótico" y, como tal, puede ser combinado ventajosamente con cultivos probióticos en productos lácteos fermentados (Marquina, 2005).

Su propiedad tecnológica va aún más allá, pues permite reemplazar la grasa por fibras alimentarias en diferentes tipos de productos lácteos. Estabiliza el agua en una estructura cremosa con la misma sensación bucal que la grasa (Wesche, 2000).

Actualmente se emplean tres procesos para la obtención de jarabes fructosados a partir de agave:

- 1) Evaporación y concentración de extractos obtenidos de la cocción y prensado de las piñas de agave
- 2) Evaporación y concentración de hidrolizados con ácidos minerales
- 3) Evaporación y concentración de hidrolizados con enzimas comerciales

De éstos, los productos de piñas cocidas e hidrólisis ácida presentan la limitante de obtener jarabes de baja pureza con tóxicos como el hidroximetilfurfural y sus hidrolizados enzimáticos presentan desventajas asociadas al costo parcialmente elevado por el uso de enzimas comerciales (López-Munguía, 2007; Bautista, 2001).

La inulina está ligada a una de las industrias de gran tradición, la tequilera: siendo abundante en las piñas maduras de *Agave tequilana*, *Weber var. Azul* que contiene aproximadamente 75% de carbohidratos, de los cuales se han identificado glucosa, dextrinas, almidón, levanas y principalmente inulina. Para la producción de tequila los carbohidratos del agave se hidrolizan por un proceso térmico dando varias moléculas de azúcares libres como la fructosa, alrededor del 20% de sacarosa y el trisacárido 1, β -fructosil inubiosa (Feingold, 1956 y Takashi, 1955, citados por Arrazola, 1969). La hidrólisis ácida del jugo de agave afecta el rendimiento y el tiempo de fermentación alcohólica debido a las reacciones colaterales, con la consecuente disminución de la actividad microbiana en la fermentación (Mancilla-Margalli y López, 2002).

La fructosa y la glucosa presentes en el agave son dos azúcares reductores que pueden ser utilizados para obtener alcohol con un proceso de fermentación, además de que pueden interactuar con las proteínas dando como resultado la caramelización o reacciones de Maillard (Téllez, 1998), por lo que es posible obtener mayor contenido de azúcares reductores a partir del contacto del jugo previo a la hidrólisis ácida, con el soporte de sol-gel y la enzima $\beta(2 \rightarrow 1)$ fructan 1-fructosiltransferasa (inulinasa) inmovilizada.

La capacidad de la enzima en un soporte se supera por ser más termoestable además de que se reportan rendimientos de 7000 $\mu\text{g hexosa}/\text{min.mg}$, determinadas éstas con 4% de sacarosa a 50°C y pH 5.0. Estos rendimientos de la inulinasa fueron

constantes en un rango de pH de 3.5 a 6.0 y con rangos de saturación de oxígeno disuelto de 2.5 a 40% de saturación (Parekh, 1985).

El ambiente en la proximidad de la enzima inmovilizada puede ser totalmente diferente del que prevalece en el seno de la fase; el ambiente modificado en las proximidades de un sistema enzimático inmovilizado ha mostrado algunas veces ser el responsable de los cambios en los perfiles pH-actividad, en el caso de varias enzimas enlazadas a un acarreador polielectrolítico. Desplazamientos de pH de 1-2.5 unidades se pueden observar en medios de reacción con valores de fuerza iónica baja (Goldstein y Katchalski, 1968); sin embargo, este efecto se atenúa a fuerzas iónicas elevadas.

Objetivo

Analizar la obtención de azúcares reductores fermentables a partir de la inmovilización de β (2-1) fructan-fructosiltransferasa por el método de sol-gel, estableciendo la mejor condición de inmovilización enzimática, considerando parámetros fisicoquímicos y bioquímicos del sistema sol-gel e inulina.

Método

Se emplearon muestras de inulina del desgarre de Agave tequilana Weber var. Azul y enzima inulinasa (β (2-1) fructan fructosiltransferasa) de *Aspergillus niger*, previa extracción (Martirosyan, 2004). Todos los estándares usados fueron grado reactivo, Sigma Chemical Co. (St. Louis Missouri, USA); los reactivos y disolventes empleados fueron grado analítico (J. T. Baker). En la primera etapa se caracterizó la enzima libre para obtener sus parámetros cinéticos; acto seguido se llevó a cabo la incorporación de la enzima en un soporte inerte llamado sol-gel.

El método de sol-gel (Brinker y Sherer, 1990) consiste básicamente en la formación de redes sólidas compuestas por elementos inorgánicos con una estructura reticular obteniéndose por medio de una reacción química a partir de una solución homogénea llamada sol compuesta de alcóxidos, agua, solvente y catalizador de hidrólisis, la cual se involucra en otra solución coloidal, efectuándose

la condensación por olación o bien por oxolación. La oxolación es descrita como una dispersión de partículas que tienen un diámetro aproximado de 100 Å; en el sol se forman miscelas suspendidas en el líquido, las cuales aumentan de tamaño en función del tiempo.

En esta etapa se forman las partículas uniformes sólidas, a partir de geles mediante mecanismos de expansión y estabilización proveniente de aglomeraciones de sólidos cuando éstos son secados a 70 °C, existiendo una contracción considerable de la red cristalina capaz de estabilizar al gel; es aquí cuando la enzima es incorporada y se observa la evolución de la estructura mediante la consolidación del gel en tiempos determinados por la formación de películas uniformes en éste.

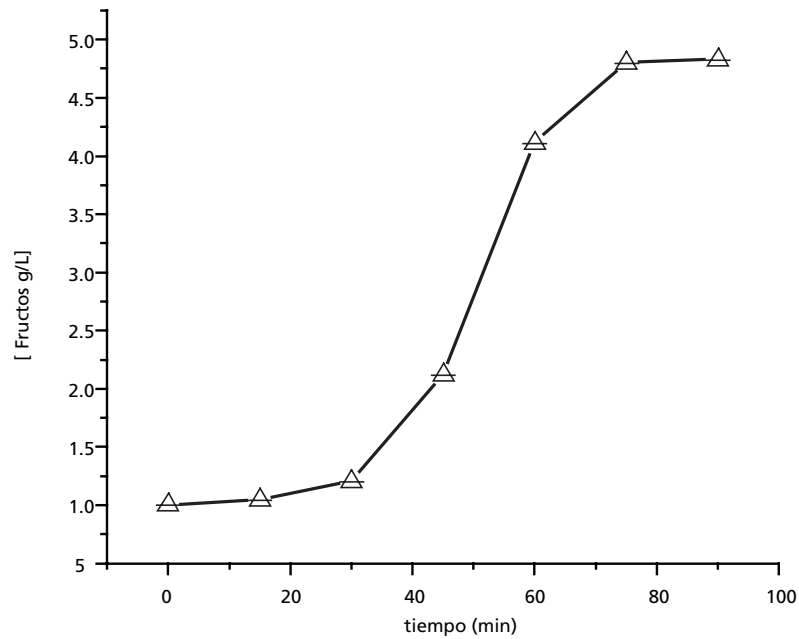
La formación del sol-gel con la inulina atrapada requirió de un lavado con un buffer de citrato y fosfatos para retirar la enzima libre y su posterior estabilización al rango de pH ya establecido.

La determinación de la actividad enzimática de la inulinasa (β (2-1) fructan fructosiltransferasa) se efectuó utilizando el método de DNS (Miller, 1959) con un espectrofotómetro Varian Cary 50 Bio y control de temperatura Lauda Instruments, que permite la cuantificación de los azúcares reductores obtenidos a partir del cocido de agave hasta el contacto con la enzima y la inulina parcialmente hidrolizada. Esta actividad se determinó en el rango de pH de 4 a 6 que corresponde al mismo de la preparación del mosto tequilero, estas mismas condiciones de trabajo se efectuaron para la enzima atrapada y los ensayos con la enzima libre.

Resultados

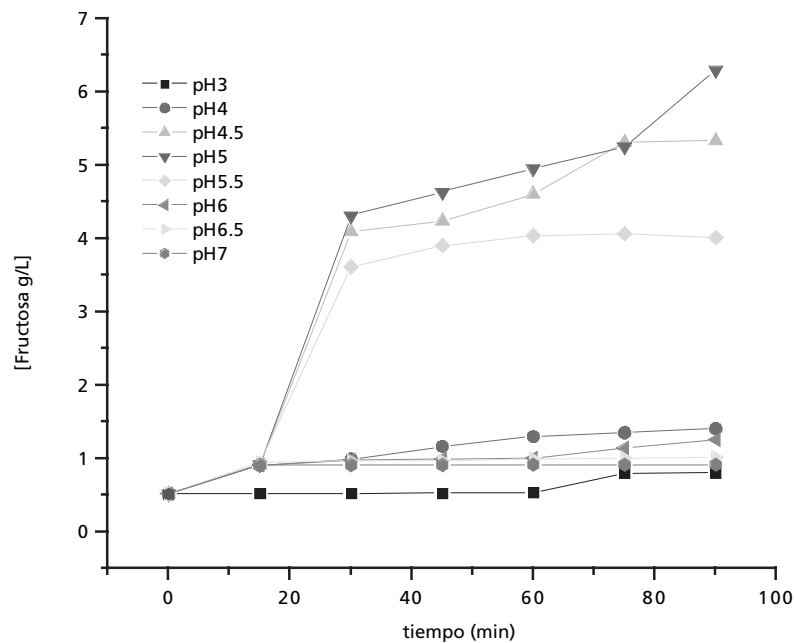
Los primeros ensayos se realizaron con la enzima libre y un sustrato inicial de agave cocido, de concentración de 1.00176 g/L de fructosa presente (figura 2), esto permite conocer la concentración de fructosa que se genera a los diferentes tiempos en contacto con la enzima libre; resultado expresado sin acumulación, se alcanzó una concentración promedio de 5 g/L a los 90 minutos que equivale a un rendimiento de hidrólisis del 40% comparado con el método de hidrólisis ácido (Arrazola, 1969; Parekh, 1985).

Figura 2. Evolución de la fructosa en contacto con enzima libre.



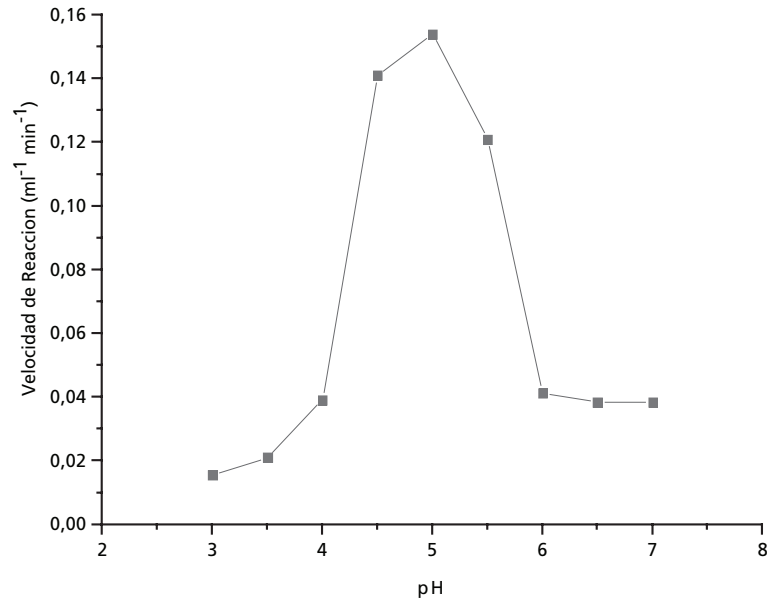
Se realizaron los ensayos de pH con la enzima inmovilizada y el sustrato de agave cocido, reportando las condiciones en que éste afecta la estabilidad de la enzima en sol-gel; la mejor respuesta se obtuvo cuando el pH alcanza un valor de 5 (figuras 3 y 4).

Figura 3. Concentración de fructosa con enzima inmovilizada a diferentes pH.



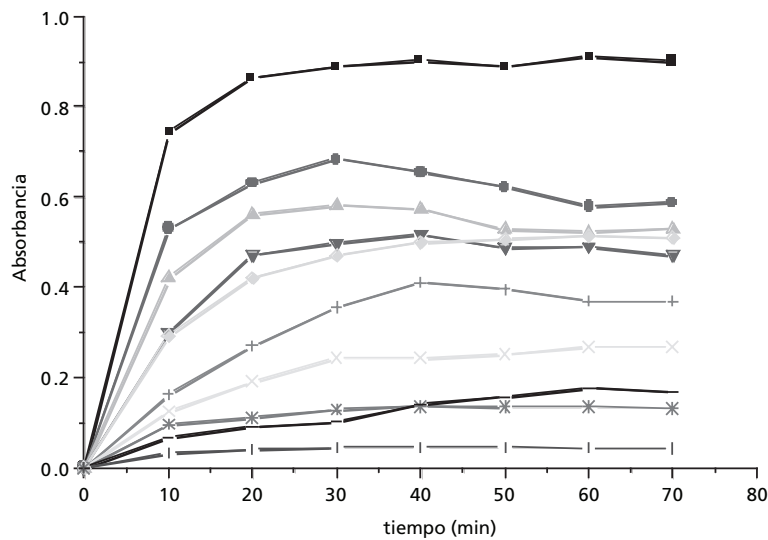
Es importante resaltar que la velocidad de reacción encontrada para la enzima soportada es de 0.1541 ml⁻¹min⁻¹ a pH de 5 y temperatura de 35o C, condición equivalente en la preparación del mosto (Parekh, 1985).

Figura 4. Efecto de pH en la velocidad de reacción para la producción de fructosa con inulinasa inmovilizada.



Como una propiedad muy importante de las enzimas es su especificidad, se encontró que la inactivación de la enzima se manifiesta de forma constante a lo largo de todas las resiembras (figura 5); todos los ensayos se realizaron bajo las mismas condiciones de temperatura y pH descritas anteriormente.

Figura 5. Decaimiento de la actividad de la enzima soportada en Sol-Gel después de varias resiembras.



La información directa del mecanismo de reacción que cataliza la especificidad de la enzima se reporta en términos de su eficiencia, la cual en comparación con la enzima libre 7000 μg fructosa/min.mg (Parekh, 1985), manifiesta ser parecida con respecto a la inmovilización con valores de 600 μg fructosa/min.mg.

Discusión


Se asume que el estado estacionario y la concentración local de sustrato y producto se determinan por la velocidad de la reacción catalítica y por las tasas de difusión del producto y del sustrato; por lo tanto, al contener la misma concentración de los mismos, se asume que el sustrato se encuentra presente en una monocapa. El entender este modo de acción de las enzimas en una inmovilización, estableciendo la correlación que existe entre la actividad enzimática y el flujo de sustrato sin agitación, genera microambientes producto de una catálisis heterogénea controlada por la disposición de la enzima inmovilizada y su sustrato (Goldstein y Katchalski, 1968).

Es de llamar la atención que en los métodos de inmovilización, siempre existe una marcada diferencia entre la cantidad de la enzima que es atrapada y la enzima que se dispone para su inmovilización, además de que los fenómenos asociados por el transporte y la presencia de azúcares requiere de los datos asociados a la cinética. Sin embargo, cuando una enzima está inmovilizada a un soporte sólido, el comportamiento cinético de la reacción cambia considerablemente, provocando una modificación de los valores de los parámetros cinéticos de la ecuación anterior. De esta manera, los parámetros observados, son sólo aparentes y no intrínsecos. (Shinji, Hiroyasu y Kenji, 1993)

Conclusión

Es evidente que la enzima se ve afectada adversamente en el curso de la reacción de inmovilización, esto debido posiblemente a la interacción entre la proteína y el polímero de soporte conduciendo a la desnaturalización y de acuerdo con la tasa de reacción, podemos establecer que efectivamente existen efectos difusivos o electrostáticos asociados.

A diferencia de una enzima soluble, la enzima soportada en una matriz ejerce su acción catalítica en un me-

dio ambiente heterogéneo, por lo cual, los fenómenos de transporte de las especies químicas involucradas en la transformación, tienen un papel determinante en las tasas de reacción observadas. 

Referencias

- Arrazola, D.F. de M (1969). Estudio del contenido de azúcares en la piña de agave tequilana. Tesis de Licenciatura en Química. Universidad Autónoma de Puebla, México, pp. 4 y 5.
- Bautista Justo, M.; García Oropeza, L.; Salcedo Hernández, R. y Parra Negrete, L. A. (2001). Azúcares en agaves (*Agave tequilana* Weber) cultivados en el estado de Guanajuato. *Acta Universitaria Universidad de Guanajuato*, 11 (1) 33-38.
- Brinker, J. y Sherer, G. W. (1990) Sol-Gel, *The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*: Academic Press Inc. Harcourt Brace & Company Publishers, Caps. 1 y 2, pp. 2-30
- Goldstein, L y Katchalski-Katzir, E. (1968) *Analytical chemical*. New York, tomo 243, p. 375
- López-Munguía Canales, A. (2007) Caracterización enzimática de fructanas. *Memorias del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, Morelia Michoacán.
- Mancilla-Margalli, N. A. y Lopez, M. G. (2002) *Generation of Maillard*. Compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber. *Var, azul. J. of Agric. and Food Chem*, 50, 806-812.
- Marquina, D.; y Santos, A. (2005) Probióticos, prebióticos y salud. *Microb Internacional*, 32 (24) 1121
- Martirosyan, G.V. (2004). Inulinase of *Bacillus subtilis*: extraction, purification and characterization. *National Academy of Sciences of RA electronic Journal of Natural Sciences*, 1(2), 38-42.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem*, 31; 426-428.
- Parekh, S. y Margaritis, A. (1985) Inulinase (beta-fructofuranosidase) production by *Kluyveromyces marxianus* in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22 pp. 446-448.
- Shinji, W.; Hiroyasu, I. y Kenji, T. (1993), Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase. *Biotech. and Bioeng*, 42, 254-258.
- Singh, P. y Kaur, G. (2006). Production of inulinases: Recent Advances. *Food Technol. Biotechnol*, 44 (2) pp151-162.
- Tellez, M. P. (1998). El cocimiento, una etapa importante en la producción de Tequila. *Bebidas Mexicanas*, 7(1) 19-20.
- Wesche, E. P. (2000) *Química de Alimentos de Origen Vegetal*: Universidad de las Américas- Puebla. Recuperado en <http://webservice.pue.udlap.mx/~pwesche/3.4.html>